

Received: 2005.11.15  
Accepted: 2006.01.05  
Published: 2006.01.31

## Rola receptorów toll-podobnych (TLR) w odporności wrodzonej i nabytej oraz ich funkcja w regulacji odpowiedzi immunologicznej\*

The role of toll-like receptors (TLR) in innate and adaptive immune responses and their function in immune response regulation

**Monika Majewska, Marian Szczepanik**

Zakład Biologii Rozwoju Człowieka Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

### Streszczenie

Odporność wrodzona jest uniwersalnym mechanizmem obrony organizmu przed infekcją. Odpowiedź ta działa w oparciu o istnienie określonej i ograniczonej liczby receptorów PRR (pattern recognition receptors) rozpoznających stałe struktury drobnoustrojów zwane PAMP (pathogen associated molecular patterns). Dzięki PRR organizm ludzki jest w stanie rozróżnić antygeny obce (nonself) od własnych (self). Jednym z przedstawicieli PRR są receptory TLR (Toll-podobne), które odgrywają główną rolę w rozpoznaniu zagrożenia i inicjacji odpowiedzi immunologicznej. Wśród komórek rozpoznających patogeny za pomocą receptorów TLR wyróżniamy: komórki układu immunologicznego (makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki tuczne, eozynofile, neutrofile, limfocyty B), komórki nabłonkowe, komórki śródbłónka, kardiomiocyty i adipocyty. Pobudzenie receptorów TLR przez produkty drobnoustrojów stanowi sygnał aktywujący mechanizmy odporności immunologicznej nieswoistej. Powoduje wzmożoną syntezę czynników przeciwbakteryjnych i cytokin prozapalnych, dojrzewanie komórek dendrytycznych (wzrost ekspresji molekuł kostymulujących i MHC), które uzyskują większą zdolność prezentacji antygenów. W niektórych przypadkach odpowiedź nieswoista jest niewystarczająca do zwalczania istniejącego zakażenia, w związku z czym niezbędna jest aktywacja odporności bardziej zaawansowanej, czyli swoistej. Aktywacja komórek APC poprzez TLR powoduje wzrost syntezy cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1, -6, -8, -12), chemokin, tlenku azotu (NO) i wzrost ekspresji molekuł adhezyjnych oraz molekuł kostymulujących (CD40, CD80, CD86) na tych komórkach. Zaistniałe zmiany w funkcjonowaniu komórek APC pozwalają na indukcję odpowiedzi immunologicznej swoistej, której wykonawcami są limfocyty T oraz limfocyty B. Receptory TLR uczestniczą również w regulacji odpowiedzi immunologicznej, ponieważ wpływają bezpośrednio lub pośrednio na funkcję komórek regulacyjnych Treg CD4+CD25+ prowadząc do ich indukcji i hamowania odpowiedzi immunologicznej lub do zniesienia ich aktywności supresyjnej (kontrasupresji).

### Słowa kluczowe:

**receptory Toll-podobne (TLR) • odporność wrodzona • struktury patogenów rozpoznawane przez receptory wrodzonej odporności (PAMP) • komórka T regulacyjna (Treg) • kontrasupresja**

\* Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu Komitetu Badań Naukowych w ramach grantów: 3 PO 5B 091 25 oraz 3 PO 5A 157 28.

## Summary

The innate immune response is a universal mechanism of host defense against infection. It functions on the basis of special receptors called PRRs (pattern-recognition receptors) which recognize conserved microbial structures called PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Due to PRRs, the human organism is able to discriminate between self and non-self antigens. Toll-like receptors (TLRs) are a group of PRRs that play a crucial role in “danger” recognition and the induction of immune response. Cells of the immune system (macrophages, dendritic cells, mast cells, eosinophils, neutrophils, B lymphocytes), epithelial cells, endothelium, cardio-myocytes and adipocytes all recognize pathogens via TLRs. TLR stimulation via microbial products activates the innate immune response. This results in an upregulated synthesis of anti-bacterial substances and pro-inflammatory cytokines as well as the activation of dendritic cell maturation (increased expression of co-stimulatory molecules and MHC antigens), thereby becoming more effective in antigen presentation. In some cases, the innate immune response is not able to eliminate infection and requires the induction of the adaptive immune response. When activated via TLRs, antigen-presenting cells (APCs) release elevated levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, and IL-12), chemokines, and nitric oxide (NO) and show increased expression of co-stimulatory molecules (CD40, CD80, CD86). All these changes in APC function allow the induction of the adaptive immune response, where both T and B lymphocytes play a crucial role. TLRs also play a role in the regulation of immune response via direct or indirect influence on the function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T regulatory cells (Tregs), which results in their induction and subsequent suppression of the immune response or a reversal of suppression (contrasuppression).

**Key words:** Toll-like receptors (TLR) • innate immune response • pathogen associated molecular patterns (PAMP) • T regulatory cell (Treg) • contrasuppression

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_60/8657.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/8657.pdf)

**Word count:** 4799

**Tables:** 2

**Figures:** 2

**References:** 91

**Adres autora:** dr hab. n. med. Marian Szczepanik, Zakład Biologii Rozwoju Człowieka CM UJ; ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków; e-mail: mmszczep@cyf-kr.edu.pl

## WSTĘP

Organizm ludzki jest stale narażony na działanie licznych czynników patogennych, dlatego też są niezbędne mechanizmy umożliwiające szybkie rozpoznanie i reagowanie na substancje zagrażające zdrowiu i życiu ustroju. W wyniku ewolucji wykształciły się dwa rodzaje odporności: odporność wrodzona (nieswoista) – stanowiąca pierwszą linię obrony organizmu oraz odporność nabyta (swoista), komórkowa i humoralna, gdzie odpowiednio komórki T lub komórki B rozpoznają epitopy charakterystyczne dla określonych drobnoustrojów. Mechanizmy odporności nieswoistej rozwijały się przez setki milionów lat, w związku z czym elementy tej odporności można zaobserwować u wszystkich organizmów żyjących na kuli ziemskiej. W odróżnieniu od mechanizmów odporności nieswoistej odporność swoistą mają wyłącznie kręgowce.

W latach 90 XX w. stwierdzono, że drobnoustroje poza licznymi epitopami mają dodatkowo specjalne, grupowe struktury wzmacniające odpowiedź, znane obecnie jako PAMP (pathogen associated molecular patterns) [35]. PAMP są rozpoznawane przez wyspecjalizowaną grupę receptorów odporności nieswoistej, określanych jako „receptory roz-

poznające wzorce” (pattern recognition receptors – PRR), których klasycznym przykładem są receptory Toll-podobne (Toll-like receptors – TLR). Receptory TLR stanowią ogniwo łączące odporność nieswoistą z odpornością swoistą, umożliwiając tym samym sprawną walkę z czynnikami patogennymi. Ponadto, receptory TLR umożliwiają komórkom układu immunologicznego odróżnianie antygenów własnych (self antigens) od antygenów obcych (nonself antigens) [34]. To właśnie odporność nieswoista ma zdolność selektywnego reagowania przeciwko strukturom występującym u bakterii, wirusów, pierwotniaków oraz grzybów.

## RECEPTORY TLR I ICH LIGANDY

Receptory Toll po raz pierwszy zidentyfikowano podczas badań polaryzacji brzuszno-grzbietowej u larw muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*). Nazwę „toll” nadano zmutowanemu genowi kodującemu receptor, który uczestniczy w rozwoju embrionalnym muszki owocowej. Kolejne doświadczenia dowiodły, że u dorosłych osobników receptory kodowane przez gen *toll* uczestniczą w mechanizmach obronnych tych owadów. Wykazano, że aktywacja receptorów Toll u tych owadów prowadzi do wzmożonej

Tabela 1. Wykaz receptorów TLR oraz ich ligandów

Receptor TLR	Ligandy (PAMP)	Pochodzenie
TLR1	lipopeptydy	bakterie, <i>Mycobacterium</i>
	czynniki rozpuszczalne (lipoproteiny)	<i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	bakteryjne lipoproteiny	bakterie ( <i>Treponema</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Borrelia</i> )
	peptydoglikan, kwas lipotejchowy	bakterie Gram-dodatnie
	lipoarabinomannan, rozpuszczalny czynnik tuberkulinowy, MALP-2	<i>Mycobacterium</i>
	glikofosfatydyloinozytol	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	glikolipidy	<i>Treponema maltophilum</i>
	poryny	<i>Neisseria sp.</i>
	zymosan	grzyby
	nietypowy lipopolisacharyd	<i>Leptospira interrogans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>
TLR2 / TLR6	MALP-2	<i>Mycobacterium</i>
	zymosan	grzyby
	rozpuszczalny czynnik tuberkulinowy	<i>Mycobacterium</i>
TLR3 (wewnątrzkomórkowy)	podwójna nić RNA (dsRNA)	wirusy
	poly(I: C)	syntetyczny
TLR4	lipopolisacharyd (LPS)	bakterie Gram-ujemne, np. <i>Escherichia coli</i>
	białka fuzyjne RSV	wirus RSV (Respiratory syncytial virus)
	białko szoku cieplnego (HSP60, HSP70, Cp96), fibrynogen	człowiek
	białko szoku cieplnego (HSP60)	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
TLR5	flagellina	bakterie Gram-ujemne
TLR7 (wewnątrzkomórkowy)	pojedyncza nić RNA (ssRNA)	wirusowe
TLR8 (wewnątrzkomórkowy)	pojedyncza nić RNA (ssRNA)	wirusowe
TLR9 (wewnątrzkomórkowy)	niemetylowane sekwencje CpG DNA	bakteryjne, wirusowe oraz syntetyczne formy CpG
TLR10	nieznane	nieznane
TLR11	nieznane	uropatogeniczny szczep <i>Escherichia coli</i> (UPECs)
	białko profilinopodobne	<i>Toxoplasma gondii</i>

syntezy peptydów przeciwko drobnoustrojom: dipterycyn (przeciwko bakteriom Gram-ujemnym) i defensyn (przeciwko bakteriom Gram-dodatnim) oraz przeciwgrzybiczych drosomycyn.

Receptory o podobnej budowie i działaniu do receptorów Toll stwierdzono na komórkach ssaków, dlatego nazwano je receptorami Toll-podobnymi (Toll-like receptor – TLR). Dotychczas opisano 11 receptorów TLR u myszy oraz 10 receptorów TLR u ludzi, jednak nie dla wszystkich zidentyfikowano ligandy (PAMP). Rodzaje receptorów TLR oraz ich ligandy przedstawiono w tabeli 1.

Pierwszym zidentyfikowanym receptorem TLR był receptor rozpoznający lipopolisacharyd (LPS), główny składnik

ściany bakterii Gram-ujemnych, zwany również endotoksyną. Początkowo uważano, że za rozpoznanie lipopolisacharydu odpowiada receptor TLR2 [85]. Dopiero badania przeprowadzone na szczepie myszy z defektem receptora TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>) dowiodły, iż brak receptora TLR2 nie powoduje zaburzeń w transdukcji sygnału i aktywacji czynnika NF-κB po stymulacji LPS. Dalsze badania wykazały, że myszy szczepu C3H/HeJ z punktową mutacją genu kodującego receptor TLR4 nie odpowiadają na działanie lipopolisacharydu i nie rozwijają wstrząsu septycznego spowodowanego nadmierną aktywacją makrofagów, prowadzącą do uszkodzenia tkanek gospodarza [23]. Ostatecznie, w oparciu o badania na szczepie myszy TLR4<sup>-/-</sup> ustalono, że receptorem rozpoznającym LPS wyizolowanym z bakterii Gram-ujemnych jest receptor TLR4.

Tabela 2. Ekspresja receptorów TLR na/w komórkach układu immunologicznego u myszy

Typ mysich komórek	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9
Komórki dendrytyczne (DC)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Makrofagi	+	+	+	+	+	+	+		+
Komórki tuczne/bazofile	+	+		+		+			+
Neutrofile		+	+	+		+	+		+
Limfocyty B	+	+	+	+	+				
Komórki T reg CD4+CD25+				+	+		+	+	
Komórki NKT		+		+					

W kolejnych badaniach zidentyfikowano pozostałe receptory TLR rozpoznające charakterystyczne struktury drobnoustrojów. Wykazano, że ligandami receptora TLR2 są bakteryjne lipoproteiny, peptydoglikan, kwas lipoteichoowy, zymosan, glikolipidy, bakteryjne poryny, lipoarabinomannan, natomiast receptor TLR5 rozpoznaje flagellinę - białko rzęsek bakterii Gram-ujemnych. Kolejną grupę receptorów PRR stanowią receptory TLR biorące udział w rozpoznaniu kwasów nukleinowych pochodzących z drobnoustrojów. Do grupy wspomnianych PRR zaliczono receptor TLR3 rozpoznający podwójną nić RNA (dsRNA) oraz syntetyczny poly(I: C); receptory TLR7 i TLR8 aktywowane przez pojedynczą nić RNA (ssRNA) oraz receptor TLR9 stymulowany przez DNA zawierający niemetylowane sekwencje CpG. Na temat receptorów TLR10 oraz TLR11 niewiele wiadomo. Dotąd nie zidentyfikowano ligandu receptora TLR10 [19], natomiast receptor TLR11 prawdopodobnie rozpoznaje struktury bakterii uropatogennych szczepu *Escherichia coli* oraz białko profilinopodobne występujące w *Toxoplasma gondii* [87]. Ekspresję receptora TLR11 wykazano w komórkach ssaków z wyjątkiem komórek ludzkich [89]. Obecność receptorów TLR11 w pęcherzu i nerkach wskazuje na istotne znaczenie tych receptorów w odpowiedzi immunologicznej chroniącej przed infekcjami układu moczowego.

Receptory TLR mogą tworzyć postaci homodimeryczne (para identycznych cząsteczek TLR) lub heterodimeryczne (dwie różne cząsteczki TLR) [91]. Istnienie receptorów TLR w postaci heterodimerycznej rozszerza wachlarz rozpoznawanych przez nie PAMP. Przykładem jest receptor TLR2, który w postaci homodimerycznej rozpoznaje składniki ściany bakterii Gram-dodatnich (bakteryjne lipoproteiny, kwas lipoteichoowy, lipoarabinomannan, glikolipidy, poryny), natomiast składnik ściany drożdży – zymosan TLR2 rozpoznaje w połączeniu z receptorem TLR6 [48]. Wykazano, że receptor TLR10 również występuje w postaci heterodimerycznej z receptorem TLR1 lub TLR2 [19].

Przez wiele lat uważano, że ligandami receptorów TLR są również białka pochodzenia endogennego, które w prawidłowych warunkach występują wewnątrz komórek, natomiast są uwalniane pod wpływem stresu komórkowego, uszkodzenia tkanek oraz ich martwicy. Do tej grupy substancji należą białka szoku cieplnego HSP60 [45,16] oraz HSP70 [77], Cp96 [78], fibrynogen [60] aktywujące re-

ceptory TLR4 oraz kompleks chromatyna-IgG stymulujący receptory TLR9 [29]. Jednak ostatnie doniesienia na temat stymulacji receptorów TLR4 przez białka HSP wskazują, iż za aktywację receptorów TLR jest odpowiedzialny LPS stanowiący zanieczyszczenie endogennych białek HSP, a nie samo białko. Wykazano bowiem, że zastosowanie wysoce oczyszczonych białek HSP60 i HSP70 lub białek nieoczyszczonych w połączeniu z polimiksyną B (antagonista LPS) nie prowadzi do aktywacji receptorów TLR [17].

#### WYSTĘPOWANIE RECEPTORÓW TLR

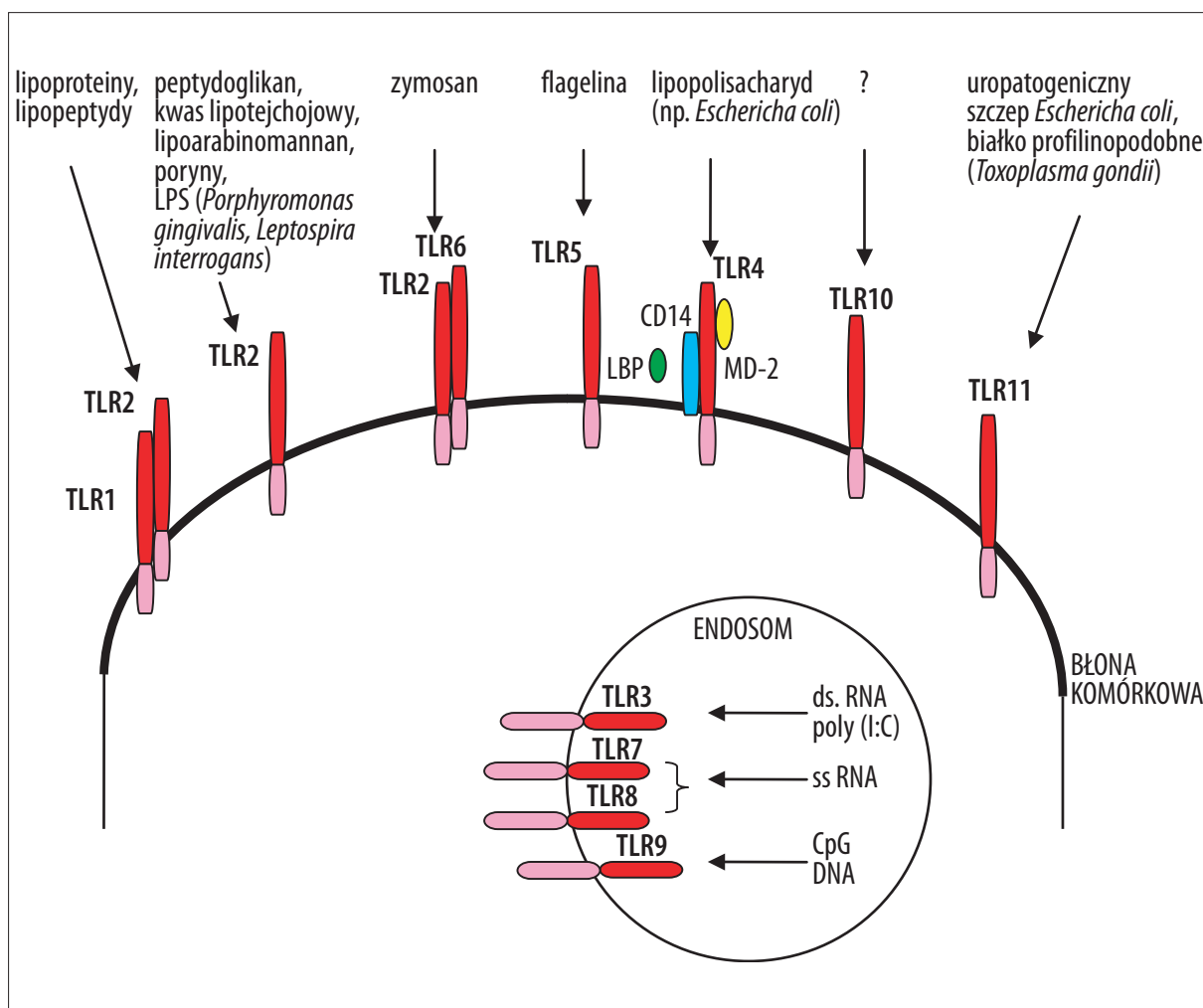
Ekspresję receptorów TLR wykazano na komórkach układu odpornościowego (makrofagi, komórki dendrytyczne, limfocyty B, komórki tuczne, eozynofile i neutrofile), komórkach nabłonkowych, śródbłonku naczyń, adipocytach, kardiomiocytach, fibroblastach oraz keratynocytach. Występowanie receptorów TLR na/w komórkach układu immunologicznego u myszy przedstawia tabela 2 [7,18].

Receptory TLR występują głównie w błonie komórkowej (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11), choć niektóre spośród nich znajdują się w błonie pęcherzyków cytoplazmatycznych (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) [43]. Wewnątrzkomórkowe receptory TLR rozpoznają materiał genetyczny drobnoustrojów, które wcześniej uległy częściowej degradacji w lizosomach. Schemat występowania receptorów TLR przedstawia rycina 1.

Lokalizacja receptorów TLR wskazuje na ich istotną rolę w indukcji odpowiedzi immunologicznej w chwili inwazji patogenu. Obecność receptorów TLR we wrotach zakażenia umożliwia szybką aktywację komórek nabłonka, które wydzielają chemokiny, cytokiny umożliwiające napływ komórek układu immunologicznego. Aktywacja receptorów TLR komórek prezentujących antygen wzmacnia procesy, których następstwem jest indukcja odpowiedzi swoistej. Istnieją również doniesienia wskazujące na obecność receptorów TLR na limfocytach NKT [8,58] oraz komórkach regulacyjnych Treg CD4+25+ [12].

#### BUDOWA RECEPTORÓW TLR ORAZ TRANSDUKCJA SYGNAŁU ICH STYMULACJI

Receptory TLR należą do grupy receptorów transmembranowych, mających część zewnątrzkomórkową, błonową i cy-



Ryc. 1. Schemat występowania receptorów TLR

toplazmatyczną. W części zewnątrzkomórkowej receptora wyodrębniono domeny bogate w reszty leucynowe (leucine-rich repeats – LRR), natomiast w części cytoplazmatycznej – domenę wykazującą wysoką homologię z receptorem IL-1R1, stąd jej nazwa TIR (Toll-IL-1 receptor) [2]. Transdukcja sygnału przez receptory TLR przebiega przy zaangażowaniu wielu białek, takich jak MyD88 (myeloid differentiation factor 88), kinaz IRAK (IL-1-IR1-associated protein kinases), kinazy TAK1 (TGF-beta-activated kinase), białek wiążących kinazę TAK1 – TAB (TAK1-binding proteins) oraz czynnika związanego z receptorem czynnika martwicy nowotworu – TRAF6 (TNF-receptor-associated factor 6) [4]. Proces transdukcji sygnału aktywacji receptorów TLR przedstawia rycina 2.

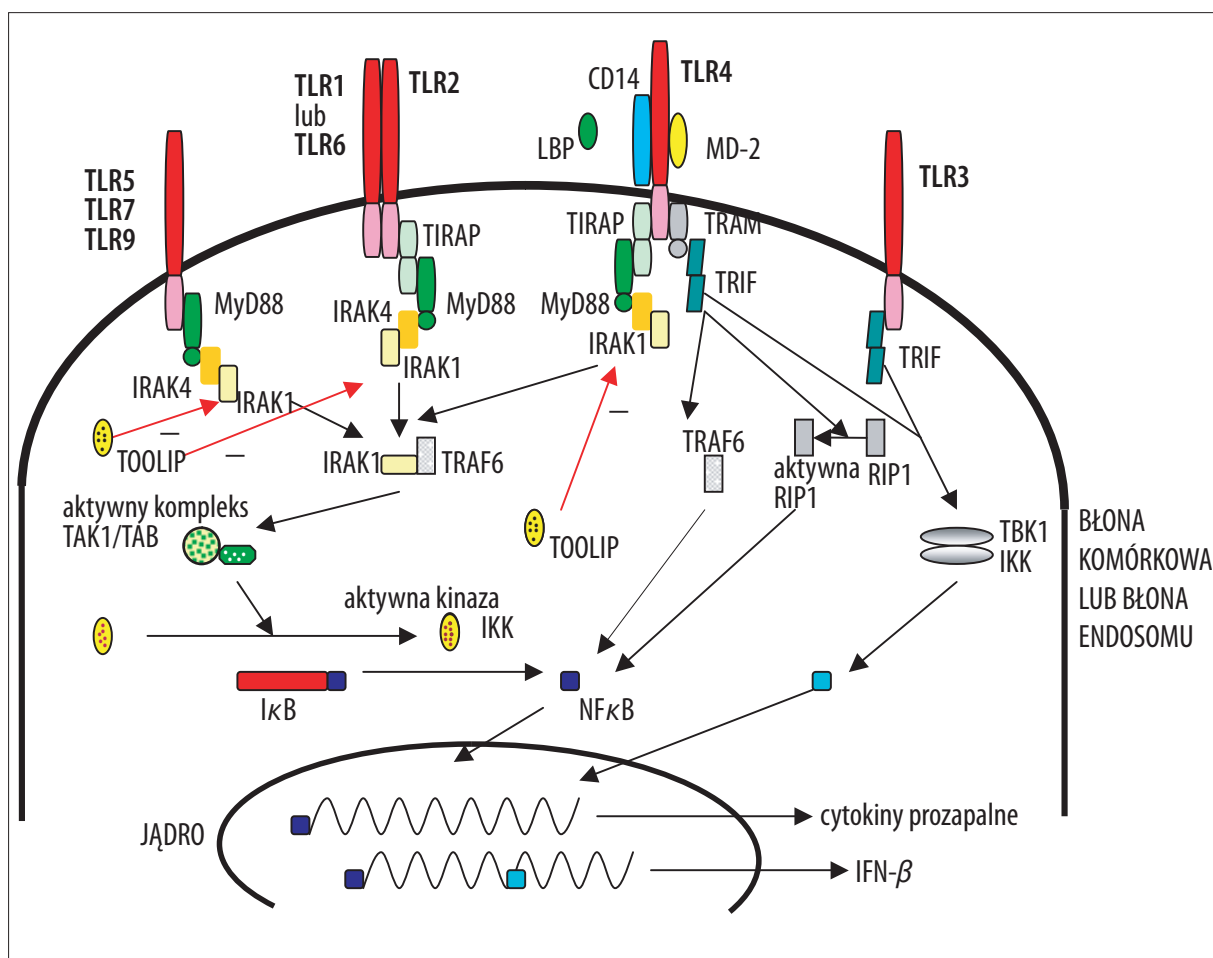
W chwili pobudzenia receptora TLR komponenta MyD88 łączy się domeną TIR bezpośrednio z receptorem TLR (TLR5, TLR7, TLR9) lub za pośrednictwem białka adaptorowego TIRAP (TLR2, TLR4) [30]. Następnie dochodzi do aktywacji kinazy IRAK4 [73], czego następstwem jest fosforylacja kolejnej kinazy IRAK-1 [1,5]. Powstająca aktywna kinaza IRAK1 zostaje uwolniona do cytoplazmy, gdzie łączy się z czynnikiem TRAF6, pozwalając tym samym na aktywację kompleksu TAK1/TAB [3]. Pobudzony kompleks TAK1/TAB aktywuje kinazę czynnika IκB (IKK) oraz kina-

zę MAP (mitogen-activated protein) [73]. Aktywna kinaza IKK powoduje fosforylację i degradację czynnika IκB (inhibitor czynnika NF-κB) prowadząc do uwolnienia czynnika transkrypcyjnego NF-κB (nuclear factor-κB). Powstały czynnik NF-κB wnika do jądra komórkowego i indukuje ekspresję genów kodujących cytokiny prozapalne.

Na uwagę zasługuje również białko TOLLIP, które hamuje transdukcję sygnału aktywacji receptora TLR [90]. Wykazano, że białko TOLLIP w komórkach niestymulowanych przez PAMP tworzy kompleks z kinazą IRAK-1. W ten sposób białko TOLLIP hamuje jej dimeryzację tłumiąc działanie kinazy IRAK-1.

Opisany przebieg transdukcji przedstawia główną drogę aktywacji receptorów TLR zależną od białka adaptorowego MyD88. Istnieje jeszcze wiele innych białek adaptorowych, zaangażowanych w transdukcję sygnału aktywacji receptorów TLR, do których należą: TIRAP (TIR-domain-containing adapter protein), TRIF (TIR-domain-containing adapter inducing IFN-β) oraz TRAM (TRIF-related adapter molecule) [84]. Wykazano, że białko TIRAP odgrywa istotną rolę w MyD88-zależnej transdukcji sygnału pochodzącego z receptorów TLR4 oraz TLR2 [82]. Białko TRIF uczestniczy w MyD88-niezależnej drodze aktywacji





Ryc. 2. Proces transdukcji sygnału aktywacji receptorów TLR

receptorów TLR3 i TLR4, które w odpowiedzi na dsRNA i LPS prowadzą do aktywacji czynnika IRF-3 (interferon-regulatory factor 3) i syntezy IFN-β [71,72]. Warto nadmienić, że na aktywację czynnika NF-κB uzyskanej w wyniku stymulacji receptorów TLR3 mają również wpływ kinazy RIP (receptor interacting protein): RIP1 i RIP3 [36]. Stwierdzono, że brak kinazy RIP1 obniża aktywację czynnika NF-κB, natomiast nie ma wpływu na aktywację kinazy JNK i syntezy IFN-β. Ponadto wykazano, że kinaza RIP3 hamuje drogę aktywacji czynnika NF-κB poprzez TRIF. W związku z powyższym receptor TLR3 zalicza się do receptorów zależnych od kinazy RIP, w przeciwieństwie do innych receptorów TLR, które w celu aktywacji czynnika NF-κB wykorzystują kinazy IRAK. Białko adaptorowe TRAM bierze udział w aktywacji receptora TLR4 MyD88-niezależnej [83]. Brak białka TRAM powoduje obniżenie syntezy cytokin prozapalnych, osłabienie proliferacji splenocytów oraz zmniejszenie ekspresji molekuł kostymulujących w odpowiedzi na LPS.

#### AKTYWACJA RECEPTORA TLR4

Najlepiej poznanym receptorem TLR jest receptor rozpoznający lipopolisacharyd bakterii Gram-ujemnych (LPS). Receptor TLR4 występuje na wielu komórkach ustroju. Jego ekspresję wykazano na komórkach układu immunologicznego (monocyty, makrofagi, neutrofile, mastocyty,

komórki dendrytyczne, limfocyty B), a także na komórkach śródbłonna i nabłonka. Aktywacja receptora TLR4 wymaga współdziałania zewnątrzkomórkowych białek. Do optymalnej ekspresji i funkcji receptora TLR4 niezbędna jest komponenta MD-2 [15,38]. Rozpoznanie LPS przez kompleks TLR4/MD-2 wymaga również obecności białka CD14 [49]. Komponenta CD14 znajduje się na powierzchni makrofagów, monocytów, granulocytów i limfocytów B. Postać błonowa CD14 (mCD14) zakotwiczona jest w błonie komórkowej za pomocą łącznika glikofosfatydyloinozitolowego. Białko CD14 charakteryzuje się dużym powinowactwem do LPS, jednak samo białko nie jest w stanie przekazywać sygnału do wnętrza komórki. Dopiero utworzenie kompleksu z TLR4 umożliwia aktywację komórki. Liczne doniesienia wskazują, że białko CD14 występuje również w postaci rozpuszczalnej (sCD14) w surowicy, w moczu i w innych płynach fizjologicznych [39,74]. Receptor sCD14 konkuruje z mCD14 o wiązanie LPS, w wyniku czego możliwa jest neutralizacja odpowiedzi na LPS *in vivo* oraz *in vitro*. Sugeruje się, że sCD14 bierze udział w aktywacji komórek niewykazujących ekspresji mCD14, w tym m.in. w stymulacji komórek śródbłonna, nabłonka i mięśni gładkich [75].

Istotną rolę w procesie aktywacji receptora TLR4 przez LPS odgrywa również białko wiążące lipopolisacharyd – LBP (lipopolysaccharide binding protein). LBP przekazuje

zuje cząsteczkę LPS kompleksowi TLR4/CD14. Ostatnie doniesienia sugerują także, że białko LBP ma znaczenie w wewnątrzkomórkowej drodze aktywacji receptora TLR4, prowadzącej do indukcji IFN- $\beta$  [25]. Wykazano również, że białko LBP jest niezbędne w fosforylacji kinaz c-Jun N-terminalnych, kinazy tyrozynowej 2, czynnika p38, IRF3 oraz STAT1, natomiast nie ma wpływu na aktywację czynnika NF- $\kappa$ B.

LPS poza swym aktywującym wpływem na makrofagi i komórki dendrytyczne należy również do silnych mitogenów limfocytów B u myszy. Aktywuje limfocyty B poprzez receptory TLR4 oraz RP105 [26]. Receptor RP105 współdziała z białkiem MD-1, podobnie jak receptor TLR4 z białkiem MD-2 [37,41]. Jednocześnie wykazano, że kompleks RP105/MD-1 jest w stanie zastąpić białko MD-2 w kompleksie z TLR4 tworząc nową strukturę rozpoznającą LPS [44]. Obecność białka RP105 stwierdzono również na komórkach dendrytycznych.

Modulatorem transdukcji sygnału TLR4 przez LPS jest także białko A20 zawierające motywy palców cynkowych. Myszy z niedoborem tego białka wykazują silną nadwrażliwość na LPS, ponieważ białko A20 hamuje transkrypcję czynników NF- $\kappa$ B i AP-1 oraz zmniejsza syntezę chemokiny IL-8 po aktywacji receptora TLR4 [47,21].

## FUNKCJA RECEPTORÓW TLR

Początkowym etapem każdej reakcji obronnej organizmu jest rozpoznanie drobnoustrojów. Większość drobnoustrojów bardzo często ulega mutacjom powodując nawracające infekcje. Jednak w strukturze drobnoustrojów istnieją cząsteczki, które muszą pozostać niezmienione, ponieważ są niezbędne do ich przeżycia i noszą nazwę PAMP (pathogen associated molecular patterns). To właśnie te struktury są rozpoznawane przez komórki układu odpornościowego za pomocą receptorów PRR (pattern recognition receptor), do których zalicza się również receptory TLR. Obecność receptorów TLR na komórkach nabłonkowych jelit i dróg oddechowych, komórkach śródbłonna (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9) [88] oraz adipocytach umożliwia szybkie rozpoznanie czynnika infekcyjnego i uruchomienie mechanizmów prowadzących do jego usunięcia. Aktywowane komórki nabłonkowe uwalniają duże ilości cytokin prozapalnych, chemokin i defensyn. Uwolnione czynniki przyciągają do miejsca inwazji komórki układu immunologicznego (leukocyty, makrofagi, komórki tuczne, komórki dendrytyczne). Na powierzchni makrofagów znajdują się receptory TLR, których aktywacja prowadzi do wzmożonej syntezy cytokin prozapalnych: IL-1, -6, -8, -12 oraz TNF- $\alpha$ . Ponadto, stymulacja receptorów TLR4 zwiększa zdolności fagocytarne makrofagów oraz powoduje wzrost wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROI's) oraz syntezę tlenku azotu (NO). Ponadto makrofagi aktywowane przez receptory TLR zwiększają ekspresję antygenów zgodności tkankowej MHC I i MHC II oraz molekuł kostymulujących CD80, CD86, co z kolei sprawia, że komórki te efektywniej prezentują antygen limfocytom T i indukują swoistą odpowiedź immunologiczną. Ponadto stwierdzono, że brak receptorów TLR2 i TLR4 na makrofagach lub białka MyD88 powoduje opóźnienie fagocytozy wielu bakterii, takich jak np. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* i *Staphylococcus aureus*. Przyczyną tego jest

zahamowanie fosforylacji czynnika p38 MyD88-zależnie, który odgrywa istotną rolę w mechanizmie dojrzewania fagosomów [9].

Istotnym i niezbędnym elementem odpowiedzi immunologicznej są komórki dendrytyczne (DC), wśród których wyróżniono subpopulację niedojrzałych komórek dendrytycznych oraz plazmocytoidalnych komórek dendrytycznych. Wykazano różnice w ekspresji receptorów TLR w obu wspomnianych subpopulacjach, i tak niedojrzałe komórki DC mają TLR 1,2,3,5,6,8, natomiast plazmocytoidalne komórki dendrytyczne wykazują ekspresję TLR 1,6,7,9,10 [69]. Niedojrzałe komórki DC mają silne właściwości endocytarne i pinocytarne. Aktywacja receptorów TLR przez PAMP powoduje dojrzewanie tych komórek, w wyniku czego tracą swe właściwości do pochłaniania antygeny, a nabywają cech komórek prezentujących antygen. Na powierzchni dojrzałych DC pojawiają się receptory chemokin, cząsteczki kostymulujące (CD40, CD80, CD86, OX40L) oraz rośnie ekspresja antygenów zgodności tkankowej (MHC klasy I i II). Ponadto, pobudzone komórki DC uwalniają duże ilości cytokin prozapalnych, takich jak TNF- $\alpha$ , IL-6, -12, -18. Przytoczone informacje wskazują, że aktywacja receptorów TLR w ostateczności umożliwia indukcję odpowiedzi immunologicznej nabytej aktywując limfocyty T.

Komórki tuczne ze względu na swe umiejscowienie w strategicznych punktach organizmu (okołonaczyniowo lub podśluzówkowo) oraz dzięki bogatemu wachlarzowi uwalnianych czynników pełnią istotną rolę w przebiegu odpowiedzi immunologicznej. Mastocyty aktywowane przez ligandy receptorów TLR (TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR9) [33] uwalniają wiele czynników, takich jak m.in. TNF- $\alpha$ , prostaglandyny, leukotrieny, histamina, co prowadzi do rozwoju procesu zapalnego mającego na celu eliminację czynnika patogenego.

Istnieją również doniesienia na temat aktywacji niektórych populacji limfocytów T przez PAMP. Badania te wskazują na aktywujący wpływ LPS na komórki NKT u myszy [70]. LPS i jego główna składowa – lipid A powodują wzrost liczby komórek T NK1.1+, które wykazują silną cytotoksyczność oraz uwalniają wiele cytokin. Obecnie uważa się, że właśnie komórki NKT aktywowane przez LPS i IL-12 wytwarzaną przez makrofagi wątroby są odpowiedzialne za reakcję Shwartzmana. Badania nasze nad mechanizmem inicjacji reakcji nadwrażliwości kontaktowej (CS) na haptene wykazały, że napływ limfocytów Th1 efektorowych do miejsca depozycji antygeny jest uzależniony zarówno od limfocytów B1 wytwarzających przeciwciała IgM [76,24], a także komórek NKT, które dostarczają limfocytom B1 cytokinę IL-4 niezbędną do ich aktywacji [11]. Wyniki naszych ostatnich badań wskazują na to, że fazę wczesną i następową ekstrawazację limfocytów Th1 efektorowych można wywołać przez podanie zwierzętom LPS. Doświadczenia przeprowadzone zarówno na myszach CD1d $^{-/-}$ , jak również Ja18 $^{-/-}$  wykazały brak fazy wczesnej reakcji CS w odpowiedzi na LPS sugerując, iż limfocyty NKT najprawdopodobniej bezpośrednio odpowiadają na LPS [8]. Wskazuje na to wzrost ich odsetka z 30 do 60% spośród leukocytów izolowanych z wątroby (liver mononuclear cells – LMC) już w ciągu godziny od podania myszom LPS. Badania cytometryczne wykaza-

ły, że komórki NKT wyizolowane od zwierząt traktowanych LPS rozpoczynają wytwarzanie IL-4 z maksimum przypadającym na 60 min od podania LPS. Jak wykazaliśmy u myszy MyD88–/– proces aktywacji komórek NKT przez LPS jest MyD88-zależny [8]. Nasze badania dotyczące aktywacji komórek NKT za pośrednictwem TLR są zgodne z obserwacjami innych badaczy, którzy za pomocą RT-PCR wykazali na komórkach NKT ekspresję receptorów TLR2 i TLR4 [58].

#### **POCHODZENIE LPS DECYDUJE O RODZAJU INDUKOWANEJ ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ *IN VIVO***

Lipopolisacharyd jest głównym składnikiem ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, który jest rozpoznawany przez komórki układu odpornościowego jako sygnał zagrożenia. Yang i wsp. jako pierwsi wykazali, że LPS stymuluje receptory TLR2 prowadząc do aktywacji czynnika NF-κB i indukcji syntezy cytokin prozapalnych [85]. Jednak kolejne badania wykorzystujące myszy z defektem receptora TLR2 podważyły wyniki uzyskane przez Yanga i wsp. dowodząc, że receptorem rozpoznającym LPS jest TLR4 [23]. Dalsze badania nad aktywacją receptorów TLR przez LPS wykazały, że w zależności od pochodzenia LPS działa na receptory TLR2 lub TLR4. Obecnie uważa się, że LPS wyizolowany z *Escherichia coli* aktywuje TLR4, podczas gdy LPS z *Porphyromonas gingivalis* stymuluje TLR2 [54]. Warto zaznaczyć, że pochodzenie LPS i stymulacja odpowiedniego receptora decyduje o rodzaju indukowanej odporności nabytej. LPS pochodzący z *Escherichia coli* pobudza receptory TLR4 indukując odpowiedź Th1-zależną, czemu towarzyszy wzrost wydzielania IFN-γ, przy małym stężeniu IL-4, -5, -13. Natomiast LPS wyizolowany z *Porphyromonas gingivalis* działa niezależnie od receptora TLR4 i stymuluje TLR2 prowadząc do odpowiedzi immunologicznej charakteryzującej się wzrostem syntezy IL-5, -10, -13 przy niewielkim wytwarzaniu IFN-γ. To odmienne pobudzenie odpowiedzi nabytej w kierunku odpowiedzi Th1- lub Th2-zależnej przez różne rodzaje LPS jest bezpośrednim następstwem działania LPS na komórki DC. Oba opisane rodzaje LPS aktywują komórki DC prowadząc do ich dojrzewania, czemu towarzyszy ekspresja molekuł kostymulujących oraz sekrecja cytokin. Jak wykazano oba rodzaje LPS stymulują syntezę IL-6 przez komórki DC, podczas gdy wytwarzanie IL-12 jest wynikiem stymulacji komórek DC poprzez LPS z *Escherichia coli*, co prowadzi do indukcji odpowiedzi Th1-zależnej.

#### **ROLA RECEPTORÓW TLR W MECHANIZMACH REGULACJI ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ**

Podłożem schorzeń autoimmunizacyjnych jest aktywacja limfocytów swoistych dla autoantygenów. Układ odpornościowy rozwinął kilka mechanizmów, które umożliwiają utrzymanie tolerancji na autoantygeny. Pierwszym z nich jest delecja klonalna, polegająca na usunięciu autoreaktywnych limfocytów T podczas dojrzewania w grasicy oraz limfocytów B w szpiku.

Mimo istnienia procesu delecji klonalnej w centralnych narządach immunologicznych część komórek autoreaktywnych przedostaje się na obwód stanowiąc potencjalne niebezpieczeństwo wystąpienia reakcji immunologicznej na własne antygeny. Kontrola ekspresji molekuł kostymulujących ko-

mórek DC odgrywa istotną rolę w utrzymaniu obwodowej tolerancji na własne antygeny. Komórki DC obecne na obwodzie charakteryzuje niski poziom antygenów MHC oraz molekuł kostymulujących (CD80 i CD86). Rozpoznanie przez limfocyty T antygenów na powierzchni niedojrzałych komórek DC, które nie mają na swej powierzchni molekuł kostymulujących prowadzi do anergii komórek T, co stanowi drugi mechanizm autotolerancji. Dopiero w przypadku inwazji organizmu przez drobnoustroje patogenne, zawierające PAMP dochodzi do aktywacji komórek DC za pośrednictwem receptorów TLR, powodując wzrost ekspresji antygenów MHC oraz molekuł kostymulujących, a to pozwala na właściwą odpowiedź na patogeny.

Trzeci mechanizm odgrywający rolę w utrzymaniu tolerancji to obecność wyspecjalizowanych komórek regulacyjnych (Treg), wśród których wyróżniono wiele populacji różniących się fenotypem i mechanizmem działania. Zadaniem wspomnianej grupy komórek regulacyjnych, znanych również pod nazwą komórek supresyjnych (Ts) jest m.in. utrzymanie pod kontrolą komórek T-autoreaktywnych, nie dopuszczając jednocześnie do odpowiedzi na autoantygeny. Najwięcej badań dotyczących roli receptorów TLR w mechanizmach regulacji odpowiedzi immunologicznej poświęcono limfocytom T o fenotypie CD4+CD25+[12]. Komórki Treg CD4+CD25+ są obecne we wszystkich obwodowych narządach limfatycznych. Ich rozwój odbywa się w grasicy i jest kontrolowany przez czynnik transkrypcyjny Foxp3. Komórki regulacyjne odgrywają istotną rolę w utrzymaniu stanu tolerancji na autoantygeny oraz antygeny nieszkodliwe/obojętne dla ustroju, nie dopuszczając tym samym do rozwoju alergii.

Prowadzone od lat badania w wielu ośrodkach naukowych na świecie były skoncentrowane głównie nad rolą receptorów TLR w indukcji odpowiedzi immunologicznej. W początkowych latach nowego milenium wykazano, że stymulacja TLR4 przez LPS prowadzi do proliferacji oraz zwiększonej aktywności komórek Treg CD4+CD25+, co wykazano w badaniach *in vitro* i *in vivo*. W jaki sposób dochodzi do aktywacji komórek Treg przez LPS nie wiadomo. Komórki Treg poza ekspresją receptorów TLR4, mają również receptory TLR5, TLR7 oraz TLR8. Można przypuszczać, że komórki te są bezpośrednio aktywowane przez LPS, jednak nie można wykluczyć, że mogą być w to również zaangażowane komórki prezentujące antygen (APC). Właśnie ten drugi mechanizm aktywujący komórki Treg okazał się dominującym w przypadku zakażeń wywołanych przez *Bordetella pertussis*, gdzie stymulacja TLR4 na komórkach APC powoduje wytwarzanie IL-10, które z kolei promują powstanie komórek supresyjnych, określonych mianem Tr1, hamujących odpowiedź immunologiczną za pośrednictwem uwolnionej IL-10 [22]. Podobne obserwacje poczyniono w czasie badań nad indukcją komórek Treg podczas zakażeń wywołanych *Candida albicans*. Netea i wsp. wykazali, że *Candida albicans* stymulując receptory TLR2 wywołuje stan immunosupresji, wzmagając syntezę IL-10 oraz zwiększając przeżywalność komórek Treg CD4+CD25+ [42]. Istnieją również doniesienia na temat roli receptorów TLR w przywróceniu aktywności supresyjnej komórek Treg CD4+CD25+ w wyniku redukcji ekspresji GITR-L (glucocorticoid-induced TNFR family – related receptor ligands) na komórkach APC. Powszechnie wiadomo, że aktywacja GITR na komórkach T efektorowych poprzez GITR-L, obecny na komórkach APC sprawia, że limfo-



cyty T stają się niewrażliwe na działanie komórek Treg [80]. Shevach i wsp. wykazali, że aktywacja komórek APC przez PAMP prowadzi do istotnego obniżenia ekspresji GITR-L na tych komórkach, co z kolei przywraca wrażliwość komórek T efektorowych na działania negatywnych sygnałów dostarczanych przez komórki Treg [61]. Przytoczone fakty świadczą o istotnej roli, jaką odgrywają receptory TLR w indukcji komórek Treg. Istnieją również doniesienia na temat roli PAMP drobnoustrojów bakteryjnych obecnych w naturalnej florze bakteryjnej organizmu oraz nieszkodliwych drobnoustrojów znajdujących się w naszym otoczeniu w procesie indukcji komórek Treg. Wykazano, iż hodowla ludzkich komórek jednojądrzastych wyizolowanych z okrężnicy z LPS wyizolowanym z naturalnej flory bakteryjnej jelit (*Bacteroides vulgatus* i *Bacteroides fragilis*) oraz z LPS patogennego szczepu *Salmonella minnesota* nie prowadzi do wzmożonej syntezy cytokin prozapalnych przez te komórki [59]. Ponadto zauważono, że makrofagi wyizolowane z okrężnicy wykazują słabą ekspresję mRNA molekuly MD-2, która odgrywa istotną rolę w przekaznictwie sygnału pobudzenia receptorów TLR4 przez LPS. Następnie przetestowano wpływ LPS wyizolowanego z *Bacteroides vulgatus* na komórki Treg CD4+CD25+. W badaniach tych stwierdzono, że LPS powoduje wzrost ekspresji genów markera CD25 oraz Foxp3 w limfocytach Treg oraz wzmożoną syntezę IL-10 przez wspomniane komórki. Wynika z tego, iż osłabiona ekspresja molekuly MD-2 i wzmożona synteza IL-10 przez komórki CD4+CD25+ pod wpływem LPS wyizolowanego z naturalnej flory bakteryjnej jelit może odgrywać główną rolę w utrzymaniu immunologicznej homeostazy układu trawiennego.

Fenomenem przeciwnym do zjawiska supresji jest proces jej zniesienia i przywrócenia prawidłowej funkcji komórek efektorowych. Wspomniane zjawisko przełamania supresji jest przez wielu autorów określane mianem kontraspresji. Pasare i Medzhitov w pracach nad rolą receptorów TLR w regulacji odpowiedzi immunologicznej wykazali, iż aktywacja TLR4 oraz TLR9 *in vitro* prowadzi do zniesienia supresji, w której uczestniczą komórki Treg CD4+CD25+ [50,51]. Mechanizm przełamania supresji za pośrednictwem aktywacji receptorów TLR jest – według tych autorów – wynikiem stymulacji komórek DC do wytwarzania IL-6, która chroni komórki T efektorowe przed regulacyjnym wpływem komórek Treg CD4+CD25+. Z kolei Yang i wsp. wykazali, że PAMP pochodzenia wirusowego mogą blokować aktywność komórek Treg CD4+CD25+, pozwalając tym samym na indukcję odpowiedzi, w której pośredniczą limfocyty T CD8 [86]. Wspomniana grupa badaczy dowiodła, że wykorzystanie w szczepionkach przeciwnowotworowych wirusów aktywujących receptory TLR może być efektywne w indukcji silnej odpowiedzi przeciwnowotworowej, w której uczestniczą komórki T CD8 cytotoksyczne.

Nasze badania nad regulacją odpowiedzi Th1-zależnej wykazały, że naskórna (e.c.) aplikacja antygeny białkowego przed aktywną immunizacją prowadzi do znacznego zredukowania zarówno reakcji CS [63], jak również redukcji objawów klinicznych w modelu zwierzęcym stwardnienia rozsianego (EAE) [67] oraz w modelu zwierzęcym reumatoidalnego zapalenia stawów (praca w przygotowaniu, Szczepanik M. i wsp.). Stwierdzona przez nas supresja, w której pośredniczą limfocyty T  $\alpha\beta$ +CD4+CD8+ nie wykazuje swoistości antygenowej [32,65], bowiem wiele testowanych przez nas antygenów białkowych wywoływa-

ło supresję odpowiedzi Th1-zależnej na ten sam antygen, który został użyty do immunizacji, a także w stosunku do antygenów niereagujących krzyżowo [53,66,68]. Można zatem przypuszczać, iż ekspozycja skóry na antygen obojętny dla ustroju, podobnie jak to się dzieje w obrębie błon śluzowych, prowadzi do indukcji stanu tolerancji. Jednak brak swoistości antygenowej w badanej przez nas tolerancji skórnej może nasuwać pewne obawy, czy kontakt z obojętnymi antygenami (np. białka) nie będzie prowadzić do uogólnionej supresji, uniemożliwiając w razie potrzeby indukowanie odpowiedzi na czynniki patogenne.

Jak już wspomniano wcześniej do indukcji odpowiedzi nabytej poza rozpoznaniem antygeny przez limfocyty T, wymagane jest dostarczenie komórkom T dodatkowych sygnałów przez komórki APC w postaci molekuł kostymulujących oraz odpowiednich cytokin. Czynnikiem, który z kolei wpływa na nabycie przez komórki APC zdolności do efektywnej prezentacji antygeny komórkom T są struktury występujące w drobnoustrojach (PAMP), które wywierają swe działanie na komórki APC za pośrednictwem m.in. receptorów TLR.

W związku z powyższym postanowiliśmy sprawdzić, czy jednocześnie podanie na skórę antygeny białkowego wraz z PAMP przed aktywnym uczuleniem haptensem pozwoli na wytworzenie odpowiedzi na poziomie porównywalnym z grupą kontrolną, gdzie przed immunizacją haptensem zwierzęta traktowano PBS na skórę. Zgodnie z naszymi przypuszczeniami podanie na skórę antygeny białkowego wraz z PAMP w odróżnieniu od samego antygeny nie prowadziło do zahamowania odpowiedzi Th1-zależnej i po aktywnym uczuleniu haptensem obserwowaliśmy odpowiedź na poziomie kontroli pozytywnej. Zatem nasze obserwacje wskazywały na możliwość przełamania tolerancji przez podanie na skórę antygeny wraz z PAMP. Pierwsze nasze doniesienie na ten temat zostało opublikowane w 2002 r. [64].

Dalsze nasze badania nad przełamaniem supresji indukowanej przez naskórną immunizację wykazały, że naskórne podanie antygeny białkowego z dodatkiem PAMP prowadzi do powstania komórek zdolnych do ochrony komórek Th1 efektorowych przed działaniem komórek T supresyjnych [31]. Komórki zdolne do przełamania tolerancji (komórki kontraspresyjne) są indukowane, gdy zwierzęta były eksponowane naskórną na antygen białkowy wraz z jednym z agonistów receptorów TLR2, TLR3, TLR4 lub TLR9. Dalsze badania wykazały, że komórką zdolną do przełamania tolerancji jest limfocyt T  $\alpha\beta$  CD4+ [52].

Jak wynika z naszych własnych badań oraz prac prowadzonych w innych ośrodkach na świecie, PAMP odgrywają istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej przez swój udział w indukcji zarówno komórek Treg, jak również komórek kontraspresyjnych.

#### **ZABURZENIA REGULACJI ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ NA POZIOMIE RECEPTORÓW TLR – IMPLIKACJE KLINICZNE**

Wraz z rozwojem cywilizacji obserwuje się stały wzrost zapadalności na choroby alergiczne zależne od limfocytów Th2, schorzeń autoimmunologicznych Th1-zależnych (stwardnienie rozsiane, cukrzyca typu 1) oraz zapalenie jelita grubego [inflammatory bowel disease (IBD)], obejm-

mującego Th1-zależną chorobę Crohna oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego, jako schorzenie Th2-zależne. Ponieważ jest obserwowana zwiększona zapadalność na schorzenia, w których uczestniczą limfocyty Th1 i Th2, w związku z powyższym dotychczasowo uznawane zaburzenie równowagi między limfocytami Th1 i Th2 jako przyczyny zwiększającej zapadalność np. na choroby alergiczne, czy też choroby autoimmunizacyjne musi mieć inną przyczynę, aniżeli przesunięcie równowagi odpowiedzi między populacjami komórek T. Pewnego rodzaju potwierdzeniem konieczności zrewidowania dotychczas uznawanego mechanizmu wzajemnie antagonistycznego wpływu komórek Th1-Th2 mogą być następujące przykłady:

- w modelu Th1-zależnej reakcji nadwrażliwości kontaktowej wymagana jest obecność IL-4 [13],
- defekty w wytwarzaniu IL-12 lub IFN- $\gamma$ , które nie prowadzą do zwiększonej częstości występowania alergii [28],
- zakażenia indukujące odpowiedź Th2-zależną, np. robaczycę korelującą ze spadkiem objawów alergii [79].

Jednym z mechanizmów mogących wytłumaczyć omawiany problem jest regulacja odpowiedzi immunologicznej przez komórki T regulacyjne. Zadaniem komórek regulacyjnych jest podjęcie decyzji, kiedy nie odpowiadać na antygeny, ponieważ dany antygen jest nieszkodliwym alergenem lub jest antygenem własnym (autotolerancja). Komórki regulacyjne decydują również, kiedy należy wyciszyć toczący się proces zapalny. Podczas przewlekłych infekcji wzrost stężenia IL-6 prawdopodobnie upośledza supresyjne działanie komórek Treg w stosunku do autoreaktywnych komórek T, czego wynikiem mogą być schorzenia autoimmunologiczne. Wiele doniesień wskazuje na istotne znaczenie IL-6 w rozwoju schorzeń autoimmunologicznych, takich jak: zapalenie stawów indukowane kolagenem (CIA) [6,57], eksperymentalne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (EAE) [56], reumatoidalne zapalenie stawów indukowane antygenem (AIA) [27,46] oraz toczeń układowy [55]. O roli komórek regulacyjnych w utrzymaniu homeostazy w układzie odpornościowym świadczą obserwacje poczynione u myszy, a także u ludzi. Zaobserwowano, bowiem że mutacje w czynniku transkrypcyjnym Foxp3 prowadzą do zaburzeń odpowiedzi immunologicznej u myszy (tzw. scurfy mice) [10] oraz u ludzi [zaburzenie związane z chromosomem X znane jako IPEX (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome)] [81]. U osobników z mutacją Foxp3 obserwuje się znikomą zapadalność na choroby alergiczne, autoimmunizacyjne oraz IBD. Pozostaje zatem pytanie, co spowodowało, że wraz z postępem cywilizacji wyżej wspomniane komórki przestają spełniać swoją istotną funkcję, a w związku z tym wzrasta zapadalność na choroby alergiczne oraz au-

toimmunologiczne. Odpowiedź na to pytanie można znaleźć w licznych badaniach na zwierzętach, które są zgodne z obserwacjami poczynionymi u pacjentów. I tak np. wykazano, że u szczurów hodowanych w warunkach jałowych znacznie łatwiej można wywołać choroby autoimmunologiczne, aniżeli u zwierząt hodowanych w warunkach normalnych [40]. Z kolei tolerancji pokarmowej na odpowiedź mediowaną przez limfocyty Th2 nie można wywołać u tzw. germ-free mice, dopóki nie zostanie u nich przywrócona komensualna flora bakteryjna [62]. Oba powyżej przytoczone przykłady mogą świadczyć o roli flory komensualnej w aktywacji komórek regulacyjnych.

Obecnie uważa się, że wraz z rozwojem cywilizacji i wzrostem higieny oraz stosowaniem antybiotyków w znacznym stopniu wyeliminowało wiele drobnoustrojów nieszkodliwych dla organizmu człowieka, a które są zdolne do stymulowania receptorów TLR. Zatem zmiany w składzie flory komensualnej mogą powodować upośledzenie aktywacji komórek T regulacyjnych. Stan taki może sprzyjać zaburzeniu negatywnej regulacji odpowiedzi immunologicznej, a tym samym prowadzić do odpowiedzi na antygeny obojętne (rozwój alergii) oraz odpowiedzi na antygeny własne (schorzenia autoimmunizacyjne).

Z kolei nasze własne badania, a także prace prowadzone przez Medzhitova wskazują na to, że receptory TLR mogą być również zaangażowane w przełamanie istniejącego stanu tolerancji, co przy spełnieniu dodatkowych warunków, np. odpowiedni haplotyp MHC mogłoby prowadzić do rozwoju np. schorzeń autoimmunizacyjnych. Zatem skąd komórki układu odpornościowego wiedzą, czy rozpoznanie PAMP ma prowadzić do aktywacji komórek regulacyjnych i hamowania odpowiedzi, czy też przełamanie istniejącego stanu tolerancji i rozwoju odpowiedzi. Dotąd jest to niewyjaśnione. Jednak badania prowadzone przez Bottomly i wsp. na modelu zwierzęcym astmy wykazały, że podanie małej dawki LPS, będącego ligandem receptora TLR4 wraz z antygenem prowadzi do rozwoju choroby, podczas gdy zastosowanie tego samego antygeny z dużą dawką LPS prowadzi do zahamowania astmy. Zatem można przypuszczać, że duże stężenie LPS aktywuje komórki Treg, natomiast małe indukuje odpowiedź TH2-zależną [20,14].

Podsumowując, receptory TLR odgrywają istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Dzięki ich stymulacji przez PAMP możliwe jest z jednej strony indukowanie odpowiedzi na patogeny, z drugiej zaś strony receptory TLR odgrywają istotną rolę w utrzymaniu homeostazy odpowiedzi immunologicznej przez udział w indukcji komórek T regulacyjnych, a także w przełamaniu stanu tolerancji.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Akira S., Hoshino K.: Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. *J. Infect. Dis.*, 2003; 187(Suppl.2): S356–S363
- [2] Akira S., Sato S.: Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2003; 35: 555–562
- [3] Akira S., Takeda K.: Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004; 4: 499–511
- [4] Akira S., Takeda K., Kaisho T.: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.*, 2001; 2: 675–680
- [5] Akira S., Yamamoto M., Takeda K.: Role of adapters in Toll-like receptor signaling. *Biochem. Soc. Trans.*, 2003; 31: 637–642
- [6] Alonzi T., Fattori E., Lazzaro D., Costa P., Probert L., Kollias G., De Benedetti F., Poli V., Ciliberto G.: Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.*, 1998; 187: 461–468
- [7] Applequist S.E., Wallin R.P., Ljunggren H.G.: Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int. Immunol.*, 2002; 14: 1065–1074

- [8] Askenase P.W., Itakura A., Leite-de-Moraes M.C., Lisbonne M., Roongapinun S., Goldstein D.R., Szczepanik M.: TLR-4 dependent IL-4 production by invariant Valpha14+Jalpha18+ NKT cells to initiate contact sensitivity *in vivo*. *J. Immunol.*, 2005; 175: 6390–6401
- [9] Blander J.M., Medzhitov R.: Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science*, 2004; 304: 1014–1018
- [10] Brunkow M.E., Jeffery E.W., Hjerrild K.A., Paepel B., Clark L.B., Yasayko S.A., Wilkinson J.E., Galas D., Ziegler S.F., Ramsdell F.: Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.*, 2001; 27: 68–73
- [11] Campos R.A., Szczepanik M., Itakura A., Akahira-Azuma M., Sidobre S., Kronenberg M., Askenase P.W.: Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant Valpha14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity. *J. Exp. Med.*, 2003; 198: 1785–1796
- [12] Caramalho I., Lopes-Carvalho T., Ostler D., Zelenay S., Haury M., Demengeot J.: Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, 2003; 197: 403–411
- [13] Dieli F., Sireci G., Scire E., Salerno A., Bellavia A.: Impaired contact hypersensitivity to trinitrochlorobenzene in interleukin-4-deficient mice. *Immunology*, 1999; 98: 71–79
- [14] Eisenbarth S.C., Piggott D.A., Huleatt J.W., Visintin I., Herrick C.A., Bottomly K.: Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 1645–1651
- [15] Fitzgerald K.A., Rowe D.C., Golenbock D.T.: Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes Infect.*, 2004; 6: 1361–1367
- [16] Flohe S.B., Bruggemann J., Lendemann S., Nikulina M., Meierhoff G., Flohe S., Kolb H.: Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J. Immunol.*, 2003; 170: 2340–2348
- [17] Gao B., Tsan M.F.: Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 22523–22529
- [18] Hallman M., Ramet M., Ezekowitz R.A.: Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr. Res.*, 2001; 50: 315–321
- [19] Hasan U., Chaffois C., Gaillard C., Saulnier V., Merck E., Tancredi S., Guet C., Briere F., Vlach J., Lebecque S., Trinchieri G., Bates E.E.: Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J. Immunol.*, 2005; 174: 2942–2950
- [20] Herrick C.A., MacLeod H., Glusac E., Tigelaar R.E., Bottomly K.: Th2 responses induced by epicutaneous or inhalational protein exposure are differentially dependent on IL-4. *J. Clin. Invest.*, 2000; 105: 765–775
- [21] Heyninck K., De Valck D., Vanden Berghe W., Van Criekeing W., Contreras R., Fiers W., Haegeman G., Beyaert R.: The zinc finger protein A20 inhibits TNF-induced NF-kappaB-dependent gene expression by interfering with an RIP- or TRAF-2-mediated transactivation signal and directly binds to a novel NF-kappaB-inhibiting protein ABIN. *J. Cell. Biol.*, 1999; 145: 1471–1482
- [22] Higgins S.C., Lavelle E.C., McCann C., Keogh B., McNeela E., Byrne P., O'Gorman B., Jarnicki A., McGuirk P., Mills K.H.: Toll-like receptor 4 –mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology. *J. Immunol.*, 2003; 171: 3119–3127
- [23] Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda K., Akira S.: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.*, 1999; 162:3749–3752
- [24] Itakura A., Szczepanik M., Campos R.A., Paliwal V., Majewska M., Matsuda H., Takatsu K., Askenase P.W.: An hour after immunization peritoneal B-1 cells are activated to migrate to lymphoid organs where within one day they produce IgM antibodies that initiate elicitation of contact sensitivity. *J. Immunol.*, 2005; 175: 7170–7178
- [25] Kato A., Ogasawara T., Homma T., Saito H., Matsumoto K.: Lipopolysaccharide-binding protein critically regulates lipopolysaccharide – induced IFN-beta signaling pathway in human monocytes. *J. Immunol.*, 2004; 172: 6185–6194
- [26] Kimoto M., Nagasawa K., Miyake K.: Role of TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 in innate recognition of lipopolysaccharide. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2003; 35: 568–572
- [27] Kobayashi H., Ohshima S., Nishioka K., Yamaguchi N., Umeshita-Sasai M., Ishii T., Mima T., Kishimoto T., Kawase I., Saeki Y.: Antigen induced arthritis (AIA) can be transferred by bone marrow transplantation: evidence that interleukin 6 is essential for induction of AIA. *J. Rheumatol.*, 2002; 29: 1176–1182
- [28] Lammas D.A., Casanova J.L., Kumararatne D.S.: Clinical consequences of defects in the IL-12-dependent interferon-gamma (IFN-gamma) pathway. *Clin. Exp. Immunol.*, 2000; 121: 417–425
- [29] Leadbetter E.A., Rifkin I.R., Hohlbaum A.M., Beaudette B.C., Shlomchik M.J., Marshak-Rothstein A.: Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, 2002; 416: 603–607
- [30] Liew F.Y., Xu D., Brint E.K., O'Neill L.A.: Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005; 5: 446–458
- [31] Lobo F., Szczepanik M., Bryniarski K., Majewska M., Ptak M., Ptak W.: Toll-like receptor (TLR) ligands reverse suppression of delayed type hypersensitivity (DTH) reactions induced by epicutaneous (EC) immunization. *FASEB J.*, 2004; 88: 21
- [32] Lobo F., Szczepanik M., Bryniarski K., Ptak M., Ptak W.: TCRαβ CD4/CD8 double-positive T cells mediate suppression of delayed type hypersensitivity (DTH) reactions induced by epicutaneous (EC) immunization. *FASEB J.*, 2004; 88: 17
- [33] Marshall J.S.: Mast-cell responses to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004; 4: 787–799
- [34] Matzinger P.: The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 2002; 296: 301–305
- [35] Medzhitov R., Janeway C.A.Jr.: Decoding the patterns of self and non-self by innate immune system. *Science*, 2002; 296: 298–300
- [36] Meylan E., Burns K., Hofmann K., Blancheteau V., Martinon F., Kelliher M., Tschoop J.: RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3 – induced NF-kappa B activation. *Nat. Immunol.*, 2004; 5: 503–507
- [37] Miura Y., Shimazu R., Miyake K., Akashi S., Ogata H., Yamashita Y., Narisawa Y., Kimoto M.: RP105 is associated with MD-1 and transmits an activation signal in human B cells. *Blood*, 1998; 92: 2815–2822
- [38] Miyake K.: Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and Toll-like receptor 4 –MD-2: unique roles for MD-2. *Int. Immunopharmacol.*, 2003; 3: 119–128
- [39] Moreno C., Merino J., Ramirez N., Echeverria A., Pastor F., Sanchez-Ibarrola A.: Lipopolysaccharide needs soluble CD14 to interact with TLR4 in human monocytes depleted of membrane CD14. *Microbes Infect.*, 2004; 6: 990–995
- [40] Moudgil K.D., Kim E., Yun O.J., Chi H.H., Brahn E., Sercarz E.E.: Environmental modulation of autoimmune arthritis involves the spontaneous microbial induction of T cell responses to regulatory determinants within heat shock protein 65. *J. Immunol.*, 2001; 166: 4237–4243
- [41] Nagai Y., Shimazu R., Ogata H., Akashi S., Sudo K., Yamasaki H., Hayashi S., Iwakura Y., Kimoto M., Miyake K.: Requirement for MD-1 in cell surface expression of RP105/CD180 and B-cell responsiveness to lipopolysaccharide. *Blood*, 2002; 99: 1699–1705
- [42] Netea M.G., Suttmuller R., Hermann C., Van der Graaf C.A., Van der Meer J.W., van Krieken J.H., Hartung T., Adema G., Kullberg B.J.: Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2004; 172: 3712–3718
- [43] Nishiya T., DeFranco A.L.: Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 19008–19017
- [44] Ogata H., Su I., Miyake K., Nagai Y., Akashi S., Mecklenbrauker I., Rajewsky K., Kimoto M., Tarakhovskiy A.: The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J. Exp. Med.*, 2000; 192: 23–29
- [45] Ohashi K., Burkart V., Flohe S., Kolb H.: Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol.*, 2000; 164: 558–561
- [46] Ohshima S., Saeki Y., Mima T., Sasai M., Nishioka K., Nomura S., Kopf M., Katada Y., Tanaka T., Suemura M., Kishimoto T.: Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 8222–8226
- [47] O'Reilly S.M., Moynagh P.N.: Regulation of Toll-like receptor 4 signalling by A20 zinc finger protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 303: 586–593
- [48] Ozinsky A., Underhill D.M., Fontenot J.D., Hajjar A.M., Smith K.D., Wilson C.B., Schroeder L., Aderem A.: The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 13766–13771
- [49] Palsson-McDermott E.M., O'Neill L.A.: Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology.*, 2004; 113: 153–162



- [50] Pasare C., Medzhitov R.: Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity*, 2004; 21: 733–741
- [51] Pasare C., Medzhitov R.: Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, 2003; 299: 1033–1036
- [52] Ptak W., Bryniarski K., Ptak M., Majewska M., Gamian A., Lobo F.M., Szczepanik M.: Toll-like receptor (TLR) ligands reverse suppression of contact hypersensitivity (CS) reaction induced by epicutaneous (EC) immunization with protein antigen. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2006 (w druku)
- [53] Ptak W., Szczepanik M., Bryniarski K., Tutaj M., Ptak M.: Epicutaneous application of protein antigens incorporated into cosmetic cream induces antigen-nonspecific unresponsiveness in mice and affects the cell-mediated immune response. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2002; 128: 8–14
- [54] Pulendran B., Kumar P., Cutler C.W., Mohamadadeh M., Van Dyke T., Banachereau J.: Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses *in vivo*. *J. Immunol.*, 2001; 167: 5067–5076
- [55] Richards H.B., Satoh M., Shaw M., Libert C., Poli V., Reeves W.H.: Interleukin 6 dependence of anti-DNA antibody production: evidence for two pathways of autoantibody formation in pristane-induced lupus. *J. Exp. Med.*, 1998; 188: 985–990
- [56] Samoilova E.B., Horton J.L., Hilliard B., Liu T.S., Chen Y.: IL-6 deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J. Immunol.*, 1998; 161: 6480–6486
- [57] Sasai M., Saeki Y., Ohshima S., Nishioka K., Mima T., Tanaka T., Katada Y., Yoshizaki K., Suemura M., Kishimoto T.: Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. *Arthritis Rheum.*, 1999; 42: 1635–1643
- [58] Shimizu H., Matsuguchi T., Fukuda Y., Nakano I., Hayakawa T., Takeuchi O., Akira S., Umemura M., Suda T., Yoshikai Y.: Toll-like receptor 2 contributes to liver injury by *Salmonella* infection through Fas ligand expression on NKT cells in mice. *Gastroenterology*, 2002; 123: 1265–1277
- [59] Shirai Y., Hashimoto M., Kato R., Kawamura Y.I., Kirikae T., Yano H., Takashima J., Kirihara Y., Saito Y., Fujino M.A., Dohi T.: Lipopolysaccharide induces CD25-positive, IL-10 producing lymphocytes without secretion of proinflammatory cytokines in the human colon: low MD-2 mRNA expression in colonic macrophages. *J. Clin. Immunol.*, 2004; 24: 42–52
- [60] Smiley S.T., King J.A., Hancock W.W.: Fibrynogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J. Immunol.*, 2001; 167: 2887–2894
- [61] Stephens G.L., McHugh R.S., Whitters M.J., Young D.A., Luxenberg D., Carreno B.M., Collins M., Shevach E.M.: Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J. Immunol.*, 2004; 173: 5008–5020
- [62] Sudo N., Sawamura S., Tanaka K., Aiba Y., Kubo C., Koga Y.: The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J. Immunol.*, 1997; 159: 1739–1745
- [63] Szczepanik M.: Regulation of contact hypersensitivity responses by different populations of T suppressor cells. Skin induced tolerance and its clinical implications. *Recent Res. Devel. Immunology*, 2002; 4: 641–667
- [64] Szczepanik M.: Skin induced tolerance and its clinical implication. *Modern Asp. Immunobiol.*, 2002; 2: 265–268
- [65] Szczepanik M., Bryniarski K., Ptak M., Tutaj M., Ptak W.: Epicutaneous (e.c.) application of TNP-coupled protein induces TCR $\alpha$  CD4+ CD8+ T cells that inhibit Th1 mediated immune response. *Centr. Eur. J. Immunol.*, 2002; 27: 126
- [66] Szczepanik M., Bryniarski K., Tutaj M., Ptak M., Skrzeczynska J., Askenase P.W., Ptak W.: Epicutaneous immunization induces alpha-beta T-cell receptor CD4 CD8 double-positive non-specific suppressor T cells that inhibit contact sensitivity via transforming growth factor-beta. *Immunology*, 2005; 115: 42–54
- [67] Szczepanik M., Tutaj M.: Epicutaneous immunization with myelin basic protein (MBP) protects from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. *Centr. Eur. J. Immunol.*, 2002; 27: 128
- [68] Szczepanik M., Tutaj M., Bryniarski K., Dittel B.N.: Epicutaneously induced TGF-beta-dependent tolerance inhibits experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, 2005; 164: 105–114
- [69] Szczepański J., Jola M., Góralski M., Mozer-Lisewska I., Samara H., Zeromski J.: Rola receptorów Toll-podobnych w odporności. *Postępy Biologii Komórki*, 2004; 3: 543–561
- [70] Takahashi M., Ogasawara K., Takeda K., Hashimoto W., Sakihara H., Kumagai K., Anzai R., Satoh M., Seki S.: LPS induces NK1.1+ alpha beta T cells with potent cytotoxicity in the liver of mice via production of IL-12 from Kupffer cells. *J. Immunol.*, 1996; 156: 2436–2442
- [71] Takeda K., Akira S.: Microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Dermatol. Sci.*, 2004; 34: 73–82
- [72] Takeda K., Akira S.: TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.*, 2004; 16: 3–9
- [73] Takeda K., Akira S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.*, 2005; 17: 1–14
- [74] Tapping R.L., Tobias P.S.: Soluble CD14-mediated cellular responses to lipopolysaccharide. *Chem. Immunol.*, 2000; 74: 108–121
- [75] Triantafyllou M., Triantafyllou K.: Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.*, 2002; 23: 301–304
- [76] Tsuji R.F., Szczepanik M., Kawikova I., Paliwal V., Campos R.A., Itakura A., Akahira-Azuma M., Baumgarth N., Herzenberg L.A., Askenase P.W.: B-cell-dependent T cell responses: IgM antibodies are required to elicit contact sensitivity. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 1277–1290
- [77] Vabulas R.M., Ahmad-Nejad P., Ghose S., Kirschning C.J., Issels R.D., Wagner H.: HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 15107–15112
- [78] Vabulas R.M., Braedel S., Hilf N., Singh-Jasuja H., Herter S., Ahmad-Nejad P., Kirschning C.J., Da Costa C., Rammensee H.G., Wagner H., Schild H.: The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein in Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 20847–20853
- [79] van den Biggelaar A.H., van Ree R., Rodrigues L.C., Lell B., Deelder A.M., Kremsner P.G., Yazdanbakhsh M.: Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet*, 2000; 356: 1723–1727
- [80] von Boehmer H.: Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.*, 2005; 6: 338–344
- [81] Wildin R.S., Ramsdell F., Peake J., Faravelli F., Casanova J.L., Buist N., Levy-Lahad E., Mazzella M., Goulet O., Perroni L., Bricarelli F.D., Byrne G., McEuen M., Proll S., Appleby M., Brunkow M.E.: X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.*, 2001; 27: 18–20
- [82] Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Sanjo H., Uematsu S., Kaisho T., Hoshino K., Takeuchi O., Kobayashi M., Fujita T., Takeda K., Akira S.: Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*, 2002; 420: 324–329
- [83] Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Uematsu S., Hoshino K., Kaisho T., Takeuchi O., Takeda K., Akira S.: TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.*, 2003; 4: 1144–1150
- [84] Yamamoto M., Takeda K., Akira S.: TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol. Immunol.*, 2004; 40: 861–868
- [85] Yang R.B., Mark M.R., Gray A., Huang A., Xie M.H., Zhang M., Goddard A., Wood W.L., Gurney A.L., Godowski P.J.: Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*, 1998; 395: 284–288
- [86] Yang Y., Huang C.T., Huang X., Pardoll D.M.: Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat. Immunol.*, 2004; 5: 508–515
- [87] Yarovsky F., Zhang D., Andersen J.F., Bannenberg G.L., Serhan C.N., Hayden M.S., Hieny S., Sutterwala F.S., Flavell R.A., Ghosh S.: TLR 11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*, 2005; 308: 1626–1629
- [88] Young S.L., Lyddon T.D., Jorgenson R.L., Misfeldt M.L.: Expression of Toll-like receptors in human endometrial epithelial cells and cell lines. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2004; 52: 67–73
- [89] Zhang D., Zhang G., Hayden M.S., Greenblatt M.B., Bussey C., Flavell R.A., Ghosh S.: A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*, 2004; 303: 1522–1526
- [90] Zhang G., Ghosh S.: Negative regulation of Toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 7059–7065
- [91] Zhang H., Tay P.N., Cao W., Li W., Lu J.: Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling. *FEBS Lett.*, 2002; 532: 171–176